

Afdeling SERH

Datum: 1983-12-12

RAPPORT 84.14

Pr.nr. 505.0620

Onderwerp: Automatische monstervoorzuivering t.b.v. de bepaling van anabolica/hormonen met diverse analysetechnieken.

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd, afdeling SERH (8x), afdeling Normalisatie (Humme), Projektbeheer, projekt-leider.

Afdeling SERH

Datum: 1983-12-12

RAPPORT 84.14

Pr.nr. 505.0620

Projekt: Ontwikkeling voor het aantonen en bepalen van hormonen.

Onderwerp: Automatische monstervoorzuivering t.b.v. de bepaling van anabolica/hormonen met diverse analysetechnieken.

Doel:

Het ontwikkelen van een geautomatiseerde monstervoorzuivering van urine-extrakten voor de bepaling van een reeks anabolica/hormonen met verschillende detektietechnieken.



Samenvatting:

Met een opstelling bestaande uit een automatisch monsterinjectionssysteem, HPLC-systeem en fraktieverzamelaar is een volledig geautomatiseerde monstervoorzuivering ontwikkeld. Na deze monstervoorzuivering is het mogelijk om de eventueel aanwezige stoffen te analyseren met diverse detektietechnieken.

Er werd een elftal anabolica/hormonen onderzocht te weten: Diethylstilbestrol, Hexestrol, Dienestrol, β -Estradiol, Medroxy-progesteron, Medroxy-progesteronacetaat, Nortestosteron, Methyltestosteron, Zernol, α -Trenbolon en β -Trenbolon.

Conclusie:

De methode is toepasbaar.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig 
Samensteller: H. Hooyerink
Projectleider: dr W.G. de Ruig 

Inleiding

Een van de moeilijkheden bij het bepalen van residuen in vlees en urine is de complexe matrix, waarin de te bepalen stoffen zich bevinden. Om de met deze matrix samenhangende storende invloeden op de detectietechnieken te voorkomen is een specifieke voorzuivering beslist noodzakelijk. Een van de geëigende methoden om stoffen te scheiden is hogedruk vloeistofchromatografie (HPLC) met een reversed-phase kolom. Dit verslag geeft de resultaten van de ontwikkelde HPLC voorzuivering van anabolica/hormonen voor urine-extrakten.

Deze methode is in eerste instantie ontwikkeld als voorzuivering voor radio-immuno-assay (RIA) en dunnelaagchromatografie (DLC).

Methoden van onderzoek

Er is uitgegaan van de volgende apparatuur:

1. Automatisch injectiesysteem, Wisp 710 B (Waters Ass.).
2. UV-detektor 254 nm en 280 nm, Model 440 (Waters Ass.).
3. Vloeistofchromatograaf, Model 6000 A (Waters Ass.).
4. Vloeistofchromatograaf, M 45 (Waters Ass.).
5. System Controller, Model 720 (Waters Ass.).
6. Data Module (Waters Ass.).
7. Fraktieverzamelaar, Model 202 (Gilson).

Vloeistofchromatografie

Er zijn twee reversed-phase kolommen gebruikt n.l. een Hypersil ODS, 5 μ kolom (250 mm x 4,6 mm) en een Hypersil ODS, 5 μ kolom (150 mm x 4,6 mm).

In beide gevallen is er een RP 18, 5 μ kolom (30 mm x 4,6 mm) als voorkolom gebruikt. Als loopvloeistof is gekozen voor een mengsel van methanol en water.

Resultaten en conclusie

Ten behoeve van radio-immuno-assay (RIA) werd als eis gesteld dat diethylstilbestrol, dienestrol en hexestrol gescheiden moesten worden. Voor de dunnelaagchromatografie (HPTLC) moesten de anabolica/hormonen in 4 of 5 frakties uitgevangen worden, waarbij iedere fractie een of meerdere anabolica/hormonen moest bevatten.

Het bleek dat de beste scheiding van de onderzochte anabolica/hormonen verkregen wordt bij gebruik van een 250 mm Hypersil ODS reversed-phase kolom, met een methanol/watermengsel van 62/38 (V/V) en bij gebruik van een 150 mm Hypersil ODS reversed-phase kolom met een methanol/watermengsel van 58/42 (V/V). Met deze mengsels methanol/water worden diethylstilbestrol, dienestrol en hexestrol volledig, op de bij het betreffende methanol/watermengsel gebruikte kolom, gescheiden.

Tabel 1 geeft het gradiëntpatroon voor een 250 mm en een 150 mm Hypersil ODS kolom.

Tabel 2 geeft het elutiepatroon van een aantal anabolica/hormonen op een 250 mm en een 150 mm Hypersil ODS kolom.

Tabel 3 geeft het aantal frakties waarin de onderzochte anabolica/hormonen zich bevinden. De frakties zijn geschikt voor dunnelaagchromatografie.

Om kruisreacties en verontreinigingen te beperken wordt na 15 minuten het percentage methanol in de loopvloeistof naar 95% gebracht.

De methode is toepasbaar gebleken voor de bepaling van deze anabolica/hormonen met behulp van twee dimensionale dunnelaagchromatografie.

Er is gekozen voor een 150 mm Hypersil ODS kolom, omdat gebleken is dat de druk bij het gebruik van een 250 mm kolom en het mengsel methanol/water dichtbij het maximum ligt van de vloeistofchromatograaf.

Mogelijk dat voor andere detectietechnieken zoals RIA, IR, EC deze monstervoorzuivering ook geschikt is.

Als hulpmiddel is in bijlage 1 t/m 4 een verkorte handleiding van de gebruikte apparatuur gegeven.

Tabel 1. Gradiëntpatroon voor een 250 mm en 150 mm Hypersil ODS kolom

Eluens A = methanol/water 95/5 (V/V)

Eluens B = methanol/water 5/95 (V/V)

A. 250 mm kolom	Tijd min.	Flow ml/min	A %	B %	Curve*
	0	1,5	63	37	-
	15	1,5	63	37	6
	25	1,5	100	0	6
	30	1,5	100	0	6
	35	1,5	63	37	6
B. 150 mm kolom					
	0	1,5	58	42	-
	15	1,5	58	42	6
	20	1,5	100	0	6
	25	1,5	58	42	8

* zie handleiding System Controller

Tabel 2. Elutiepatroon anabolica/hormonen op een Hypersil ODS kolom (UV-detektie 254 nm of 280 nm)

Retentietijd (min)

	250 mm kolom*	150 mm kolom**
β-Trenbolon	9,7	6,7
α-Trenbolon	10,3	7,8
Zeranol	11,8	8,6
Nortestosteron	11,8	8,5
β-Estradiol	12,5	9,5
Diethylstilbestrol (trans)	13,1	10,3
Dienestrol	14,9	11,5
Hexestrol	16,2	12,6
Methyltestosteron	19,0	14,5
Medroxy-progesteron	22,5	19,4
Medroxy-progesteronacetaat	24,0	21,4

* : gradiëntelutie volgens tabel 1 A

** : gradiëntelutie volgens tabel 1 B

Tabel 3. Frakties geschikt voor dunnelaagchromatografie

Fractie	
1	α-,β-Trenbolon
2	Zeranol
	Nortestosteron
	β-Estradiol
	Diethylstilbestrol (trans)
	Dienestrol
3	Hexestrol
4	Methyltestosteron
	Diethylstilbestrol (cis)
5	Medroxyprogesteron
6	Medroxyprogesteronacetaat

Literatuur

1. EVATH rapport (juli 1982), R.W. Stephany.

Vergelijkend onderzoek in Nederland naar de aantoonbaarheid van diethylstilbestrol (DES) in kalver- en runderurine door middel van verschillende chemische methoden.

2. Jansen, E.H.J.M., Both-Miedema, R., Van den Bosch, D., Van den Berg, R.H. en Stephany, R.W.

Zuivering van kalver-, runder- en varkensurine via hogedruk vloeistofchromatografie voor onderzoek naar de aanwezigheid van anabolica. Volkgezondheid, V.A.R., 40 (1982), 159-161.

Programmeren Wisp

1. Vul het rek met monsters.
2. AUTO/SINGLE knop op AUTO.
3. Press SAMPLE NO. knop.
4. Press 0, press enter.
5. Press INJ.VOL. knop, press injectievolume (<200 ul), press enter.
6. Press RUN TIME knop, press run time, press enter.
7. Press NO.OF INJ. knop, press aantal injecties per monster, press enter.
8. Press RUN/STOP knop.

Programmeren fraktieverzamelaar

Stel er moeten 3 frakties uitgevangen worden.

b.v. fraktie 1 na 7,50 min: 1,00 min.

fraktie 2 na 9,00 min: 1,50 min.

fraktie 3 na 11,50 min: 1,75 min.

1. Select mode : PROG, enter
2. Rade Code : nummer, enter
3. Waste : n.v.t., enter
4. Inject (= startsignaal) : 0,01, enter
5. Wait : 0,00, enter
6. NB Coll : 3, enter
7. 1 Drain : 7,50, enter
8. 1 Coll : 1,00, enter
9. 2 Drain : 0,50, enter
10. 2 Coll : 1,50, enter
11. 3 Drain : 1,00, enter
12. 3 Coll : 1,75, enter
13. Safety (0/1) : 0, enter
14. Rinse : 1,00, enter
15. NB Cycles : 96, enter (96 is afhankelijk van aantal monsters in de Wisp)
16. Posit./Cycle : 3, enter

Programmeren DATA MODULE

- 1 : Aan
- 2 : Press 0, enter
 - Input: date, NEXT
 - Input: time, NEXT
 - Input: Chart Speed, NEXT
 - Input: Plot Mode, NEXT
 - Input: Pen 2 On/Off, NEXT (0): off (1): on
 - Input: Pen 1 10, NEXT
 - Input: Pen 2 90, NEXT
 - Input: Auto Zero 0/1, NEXT
 - Input: LC/GPC 0/1, NEXT (1) LC
- 3 : Press clear
- 4 : Press 33, ENTER
 - Input: Formaat Worksheet, NEXT (zie handleiding)
 - Input 34: RUN NUMBER 0-99 ENTER
- 5 : Press 48, ENTER
 - Input, Detektor 1: NEXT
 - Input, Detektor 2: ENTER
- 6 : Press 60, ENTER
 - Input Height: 1, ENTER

N.B.: Error PP: Papier is op.

Programmeren System Controller (zie figuur 1)

1. System Controller: aan
2. Cassette erin
3. Press: NEXT MODE, NEXT MODE
 Display: PUMP MONITOR (1)
4. Press: NEXT PAGE
 Display: ISOCRATIC INITIAL (2)
5. Input: FLOW: (ml/min), NEXT VALUE
 % A : , NEXT VALUE
 % B : , NEXT VALUE
 % C : , ENTER
6. Press: NEXT PAGE
 Display: GRADIENT (3)
7. Input: Time (min) , NEXT VALUE
 Flow (ml/min), NEXT VALUE
 % A , NEXT VALUE
 % B , NEXT VALUE
 % C , NEXT VALUE
 Curve (1/11) , ENTER
8. Press: NEXT PAGE
 Display: PUMP CONTROL (4)
9. Input: Run time : (min) , ENTER
 Low pressure limit : (psi) , ENTER
 High pressure limit: (psi) , ENTER
 Transfer mode : Yes of No, ENTER
 Plot mode : Pressure, A,B,C, %A, %B of %C ENTER
 Delay time : (min) , ENTER
10. Press: NEXT PAGE
 Display: SOLVENT (5)
11. Input: Solvents, ENTER
12. Press: NEXT PAGE
 Display: EXTERNAL EVENTS (6)
13. Input: Time: (min), NEXT VALUE
 Event no: (1/8), NEXT VALUE
 Status: ON, OFF of PULSED, ENTER

14. Press: NEXT PAGE
Display: EVENT DESCRIPTION (7)
15. Input: Event no (1/8), NEXT VALUE
Description , ENTER
16. Press: NEXT PAGE
Display: PUMP MONITOR (1)
17. Press: NEXT MODE
Display: CONDITIONS REPORT FORMAT (8)
18. Input: Full, short of none, ENTER
19. Press: NEXT MODE
Display: SYSTEM MONITOR (9) ENTER
20. Input: Date, NEXT VALUE
Time, NEXT VALUE
Operator, ENTER
21. Press: NEXT PAGE
Display: OPERATION TABLE (10)
22. Input: Op.No: (1/48), NEXT VALUE
Time : (min) , NEXT VALUE
Vials From : (1/48), NEXT VALUE
Thru : (1/48), NEXT VALUE
Method: (1/48), ENTER
23. Press: NEXT PAGE
Display: METHOD TABLE (11)
24. Input: Method no (1/48), NEXT VALUE
Method name , NEXT VALUE
Pump set (1/48), NEXT VALUE
Column , NEXT VALUE
Detectors , ENTER
25. Press: NEXT PAGE
Display: SAMPLE TABLE (12)
26. Input: No (1/48) , NEXT VALUE
Sample name, NEXT VALUE
Units , ENTER
- (22 t/m 26 worden alleen gebruikt bij Multi-Run operations)
27. Press: NEXT PAGE
Display: TAPE OPERATION (13)

28. Input: Command: Load (= oproepen file van tape)

List (= oproepen file names van tape)

Delete (= verwijderen file van tape)

Save (= opslaan op tape onder file-name)

Rename

Compress

(Save - alleen nadat Wisp, DATA MODULE en SYSTEM CONTROLLER zijn ge-
programmeerd)

29. Press: NEXT PAGE, NEXT MODE

Display: PUMP MONITOR (1)

(Display PUMP MONITOR valt na ca. 3 min weg).